动 物 学 研 究 2005, Feb. 26 (1): 61-68 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

基于12S和16S rRNA序列的湍蛙属部分物种的系统发育关系

金义文[1,2], 江建平[1,*], 谢 锋[1], 郑中华[1], 徐俊晓[1]
(1. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 测定了湍蛙属6个种共10个种群, 以及4个外群种的线粒体12S和16S rRNA基因片段, 比对后有940 bp序列, 发现352个变异位点、186个简约性位点。运用NJ法、MP法、ML法构建了系统关系树, 各系统树一致表明内群为一单系群, 分为两组: 第一组中, 四川湍蛙两种群先聚合, 再和棕点湍蛙聚为一支; 第二组中, 香港湍蛙和戴云湍蛙聚为一支, 而香港大屿山离岛湍蛙种群首先与华南湍蛙相聚, 再与武夷湍蛙构成姐妹支。研究结果表明: 香港地区增加1种湍蛙分布; 戴云湍蛙是一有效种; 四川湍蛙的石棉和洪雅种群间遗传差异达到或超过其他种间的分歧水平。

关键词: 湍蛙属; 12S rRNA基因; 16S rRNA基因; 香港
中图分类号: Q959.53 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2005)01-0061-08

Phylogenetic Relationships Among Some Species of *Amolops* Inferred from 12S and 16S rRNA Gene Sequences

JIN Yi-wen [1,2], JIANG Jian-ping [1,*], XIE Feng [1], ZHENG Zhong-hua [1], XU Jun-xiao [1]
(1. *Chengdu Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Chengdu* 610041, *China*;
2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: Mitochondrial gene fragments of 12S and 16S rRNA of six species including 10 populations (*Amolops*), and 4 outgroup species were sequenced. Aligned sequences showed that there were 940 bp in length with 352 variable sites and 186 parsimony sites. Phylogenetic relationships were analyzed through NJ, MP, and ML methods and got a consistent topological structure, and it indicated that all of the ingroup were clustered together and comprised two groups. In the group Ⅰ, two populations of *A. mantzorum* were first clustered together as a sister clade to *A. loloensis*. In the group Ⅱ, *A. daiyunensis* and *A. hongkongensis* were clustered together, the *Amolops* sp. from Lantau Is. of Hong Kong was clustered with *A. ricketii* together as a sister group to *A. wuyiensis*. This result indicates that there are at least two species of *Amolops* in Hong Kong, and that *A. daiyunensis* is a valid species. The fact that genetic differentiation between the Hongya and Shimian populations of *A. mantzorum* is even bigger than that between them and *A. loloensis* strongly implies that there maybe are some unknown species contained in *A. mantzorum*.

Key words: *Amolops*; 12S rRNA gene; 16S rRNA gene; Hong Kong

湍蛙属(*Amolops*)属于无尾目蛙科, 目前世界共发现34个种, 中国24个种, 其中19个为中国特有种(Frost, 2004), 分布于东南亚部分国家和我国境内的西南、华南地区和海南岛等地。该属以蝌蚪口后腹部有吸盘, 成体指末端膨大具有吸盘且其背面有横沟而区别于其他种类。

Fei (1999) 把中国湍蛙属的物种分为崇安湍蛙种组、凹耳湍蛙种组、四川湍蛙种组、华南湍蛙种组、海南湍蛙种组5个类群。四川湍蛙种组包括四川湍蛙、理县湍蛙、棕点湍蛙、棘皮湍蛙; 华南

收稿日期: 2004-08-20; 接受日期: 2004-12-15
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30000018); 国家财政部资助的中国科学院生物科学与技术特别支持费(STZ-01-19); 四川省科技厅重点项目; 香港野生生物保护基金会项目
* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: jiangjp@cib.ac.cn

湍蛙种组包括华南湍蛙、武夷湍蛙、戴云湍蛙、香港湍蛙。四川湍蛙种组中的四川湍蛙（*A. mantzorum*）广布于四川、云南两省西部山区，Liu (1950)、Su et al (1986)、Wu & Zhao (1984) 分别从中订立了 3 个不同的物种，但 Fei & Ye (2001) 则建议暂将它们均归入四川湍蛙。

Yang (1991a) 认为戴云湍蛙（*A. daiyunensis*）是香港湍蛙（*A. hongkongensis*）的同物异名，然而 Fei et al (1990) 和 Fei (1999)、Zhao et al (2000) 认为它是有效物种。Jiang & Xie (2003) 在香港考察时首次在大屿山离岛采得湍蛙属标本，但发现这些标本与香港现有记录香港湍蛙（*A. hongkongensis*）(Pope & Romer, 1951) 在形态上明显不同，而与华南湍蛙（*A. ricketti*）相近。

Jiang & Zhou (2001a, b)、Jiang et al (2003) 应用 12*S* rRNA 和 16*S* rRNA 基因于蛙科和锄足蟾科的系统关系研究，结果能较好地反映其属、种水平及种内的遗传差异和揭示它们的系统关系；因此，这两个基因可以应用于分析较低分类阶元间的系统关系。鉴于以上情况，本文依据线粒体 12*S* 和 16*S* rRNA 基因序列分析四川湍蛙种组 2 种、华南湍蛙种组 4 种及香港新发现的湍蛙共 10 个种群间的系统关系，进而探讨四川湍蛙的遗传分化情况和香港新发现湍蛙的分类地位等问题。

1 材料和方法

1.1 样品及其信息

测定了湍蛙属 6 种共 10 个种群样品的线粒体 12*S* 和 16*S* rRNA 基因序列。以黑龙江林蛙（*Rana amurensis*）、福建大头蛙（*Limnonectes fujianensis*）、黑斑侧褶蛙（*Pelophylax nigromaculata*）、大绿臭蛙（*Odorrana livida*）4 种对应基因序列作为外群分析。分类系统依据 Fei (1999)。有关样品及外群信息见表 1。

1.2 总 DNA 提取

取动物腿部组织或蝌蚪的尾部肌肉组织，置 1.5 mL 的 Eppendorf 管中。加入裂解缓冲液，然后再加入 10%的 SDS，20 mg/mL 蛋白酶 K 水浴。然后采用常规酚－氯仿提取总 DNA，4 ℃保存备用。

1.3 目的基因片段的扩增和序列测定

扩增 12*S* rRNA 基因序列引物为 L1091 (5′-gcttcaaatactgggattagaccccactat-3′), H1478 (5′-tgactgcagagggtgacgggcggtgtgt-3′) (Kocher et al, 1989)；扩增 16*S* rRNA 基因片段的引物为 L (5′-cgcctgtttaccaaaaacat-3′), H (5′-ccgggctgaactcagatcacgt-3′) (Simon et al, 1994)。L 代表上游引物，H 代表下游引物。反应体积为 30 μL，Promema 公司配备的反应缓冲液 3 μL，25 mmol/L $MgCl_2$ 2 μL，2.5 mmol/L dNTP 2 μL，10 pmol/μL 引物 1 μL，5 U/μL *Taq* 聚合酶 0.2 μL，总 DNA 1μL（含 10～100 ng DNA），ddH_2O 补足到 30 μL。PCR 反应在 PTC 200 或 PE 2400 型基因扩增仪上进行。95 ℃预变性 4 min；95 ℃变性 40 s，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 40 s，循环次数为 35 次；72 ℃再延伸 7 min。扩增产物用 Wizard™ PCR Preps DNA 纯化试剂盒（Promega 公司）纯化。序列测定委托大连宝生物工程公司采用 ABI377 基因分析仪测定。

1.4 序列分析

Clustal W 程序 (Thompson et al, 1994) 对测定的序列进行对位排列，合并 12*S* 和 16*S* rRNA 基因片段的序列，用 MEGA 2.1 (Kumar et al, 2001) 分析各物种间 DNA 序列差异。同时采用 MEGA 2.1 (Saitou & Nei, 1987) 中的邻接法（neighbor-joining method, NJ），PAUP4.0 (Swofford, 1998) 中的最大简约法（maximum parsimony method, MP）和最大似然法（maximum likelihood method, ML）推测系统关系。NJ 法中，去除成对插入缺失，依据 Kimura 2-parameter 模型推测距离。MP 法中，每个碱基作为无序排列位点，并具有相等的权重，采用启发式 TBR（tree-bisection-reconnection）搜索。应用 Modeltest 3.06 (Posada & Crandall, 1998)，依据 Akaike Information Criterion (AIC) 选择 GTR + G 作为最适进化模型进行 ML 法分析，有关参数为 Base = (0.3145 0.2594 0.1961), Nst = 6, Rmat = (3.4149 5.8004 4.0257 0.3779 15.5674), Rates = gamma, Shape = 0.4421, Pinvar = 0。以黑龙江林蛙、福建大头蛙、黑斑侧褶蛙和大绿臭蛙的相同基因片段的序列作为外群分析。自展检验（bootstrap test, Felsenstein, 1985）估计 3 种方法所构系统树的可靠性，重复次数均为 1 000。

2 结 果

2.1 DNA 序列特征

2.1.1 序列比对与位点特征　本文分析的 DNA 序列全部存入 GenBank 中，登录号见表 1。

12*S* rRNA基因序列经Clustal W软件进行比对

表 1　样品种类及采集地

Tab. 1　Species and locality of the samples studied in this work

样品种名 Species of samples	地点（图、表和附录中的代码） Locality (code in Fig., Tab. and Appendix)	GenBank 登录号 Accession number in GenBank*	
		12*S*	16*S*
外群 Outgroup			
福建大头蛙 *L. fujianensis*	福建南靖 Nanjing, Fujian	AF205559	AF315152
大绿臭蛙 *O. livida*	四川合江 Hejiang, Sichuan	AF205565	AF315160
黑斑侧褶蛙 *P. nigromaculata*	安徽霍丘 Huoqiu, Anhui	AF205548	AF315138
黑龙江林蛙 *R. amurensis*	黑龙江牡丹江 Mudanjiang, Heilongjiang	AF205543	AF315133
内群 Ingroup			
棕点湍蛙 *A. loloensis*	四川宝兴 Baoxing, Sichuan	AY851085	AY851079
四川湍蛙 *A. mantzorum*	四川石棉 Shimian, Sichuan (SM)	AY851083	AY851089
四川湍蛙 *A. mantzorum*	四川洪雅 Hongya, Sichuan (HY)	AF315125	AF315148
戴云湍蛙 *A. daiyunensis*	福建南靖 Nanjing, Fujian	AF205556	AF315147
香港湍蛙 *A. hongkongensis*	香港新界 the New Ter., Hong Kong (NT)	AY851080	AY851086
香港湍蛙 *A. hongkongensis*	香港香港岛 the Hong Kong Is., HK (HK)	AY851081	AY851087
湍蛙种 *A.* sp.	香港大屿山离岛 the Lantau Is., HK (DYS)	AY851082	AY851088
华南湍蛙 *A. ricketti*	广西龙胜 Longsheng, Guangxi (GX)	AY851084	AY851090
华南湍蛙 *A. ricketii*	四川合江 Hejiang, Sichuan (SC)	AF205557	AF315149
武夷湍蛙 *A. wuyiensis*	安徽黄山 Huangshan, Anhui	AF205555	AF315146

* AY851079 - AY851090 为本次新测序列，其余引自江建平和周开亚（2001a，b）和 Jiang & Zhou（印刷中）。

* Sequences of accession number of AY851079 - AY851090 are sequenced in this study, and the others come from Jiang & Zhou (2001a, b, in press).

排列后共有 400 bp，其中变异核苷酸位点 149，简约位点 82；内群物种间变异核苷酸位点 75，简约位点 60，插入缺失位点内群仅有 15 处，内群转换与颠换之比为 3.0（附录 1，位点序号在 400 以前）。碱基 T、C、A、G 平均含量分别为 22.6%、26.1%、31.4%、19.9%。

16*S* rRNA 基因序列用 Clustal W 软件进行比对排列，共有 540 bp，其中变异核苷酸位点 203，简约位点 104；内群物种间变异核苷酸位点 108，简约位点 66，插入缺失位点内群 16（附录 1，位点序号在 401 以后）。T、C、A、G 碱基平均含量分别为 23.6%、25.6%、30.2%、20.6%，内群转换与颠换之比为 1.5。

12*S* 和 16*S* 合并后的 T、C、A、G 碱基平均含量分别是 23.2%、25.8%、30.7%、20.3%，转换与颠换之比为 1.7。

2.1.2　同一物种内单倍型情况　从附录 1 可知，华南湍蛙广西种群与四川种群在 16*S* rRNA 基因上有 8 个碱基的变异位点，其中 3 处转换和 5 处颠换；在 12*S* rRNA 基因上发现 2 处替代，为 CT 颠换。香港湍蛙新界种群与香港岛种群在 16*S* rRNA 基因完全一致，而在 12*S* rRNA 基因上有一个 AC 颠换。四川湍蛙石棉种群与洪雅种群在 16*S* rRNA 基因上有 26 处替代，其中 12 处转换，14 处颠换；在 12*S* rRNA 基因上只有 2 处 CT 颠换。

2.1.3　遗传距离特征　表 2 为依据 Kimura 2-parameter 模型的遗传距离，在外群和内群之间是 0.095（黑斑侧褶蛙与棕点湍蛙）到 0.281（戴云湍蛙与福建大头蛙）；在内群中，种内距离从 0.001（香港湍蛙新界种群与香港岛种群）到 0.032（四川湍蛙石棉种群与洪雅种群），种间距离从 0.016（棕点湍蛙与四川湍蛙石棉种群）到 0.148（四川湍蛙洪雅种群与香港大屿山湍蛙种）。

2.2　物种系统关系

用 NJ 法、MP 法及 ML 法三种方法分析所得系统进化关系树的拓扑结构完全一致（图 1）。MP 法仅产生一棵最简约树，树长 582，CI 值为 0.7509，去除非简约信息位点的CI值为0.6348。内群的6种

表2 湍蛙属6种（10个种群）12*S* 和 16*S*rRNA 基因片段的 Kimura 2-parameter（去除成对缺失）

Tab. 2 Kimura 2-parameter distances among mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA gene sequences from six species (10 populations) of *Amolops* with pairwise deletion for indel sites

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 *L. fujianensis*													
2 *O. livida*	0.215												
3 *R. amurensis*	0.255	0.151											
4 *P. nigromaculata*	0.241	0.146	0.131										
5 *A. ricketti* (SC)	0.259	0.158	0.177	0.123									
6 *A. ricketti* (GX)	0.247	0.151	0.170	0.114	0.011								
7 *A. wuyiensis*	0.256	0.156	0.172	0.114	0.039	0.030							
8 *A.* sp. (DYS)	0.254	0.158	0.157	0.113	0.022	0.013	0.031						
9 *A. hongkongensis* (NT)	0.245	0.141	0.168	0.113	0.079	0.074	0.073	0.070					
10 *A. hongkongensis* (HK)	0.244	0.140	0.167	0.112	0.078	0.073	0.072	0.069	0.001				
11 *A. daiyunensis*	0.281	0.172	0.201	0.139	0.103	0.106	0.100	0.105	0.043	0.043			
12 *A. mantzorum* (HY)	0.269	0.166	0.187	0.126	0.147	0.145	0.139	0.148	0.126	0.125	0.140		
13 *A. mantzorum* (SM)	0.230	0.137	0.155	0.104	0.118	0.110	0.110	0.116	0.098	0.097	0.127	0.032	
14 *A. loloensis*	0.235	0.133	0.155	0.095	0.116	0.108	0.111	0.113	0.099	0.098	0.128	0.048	0.016

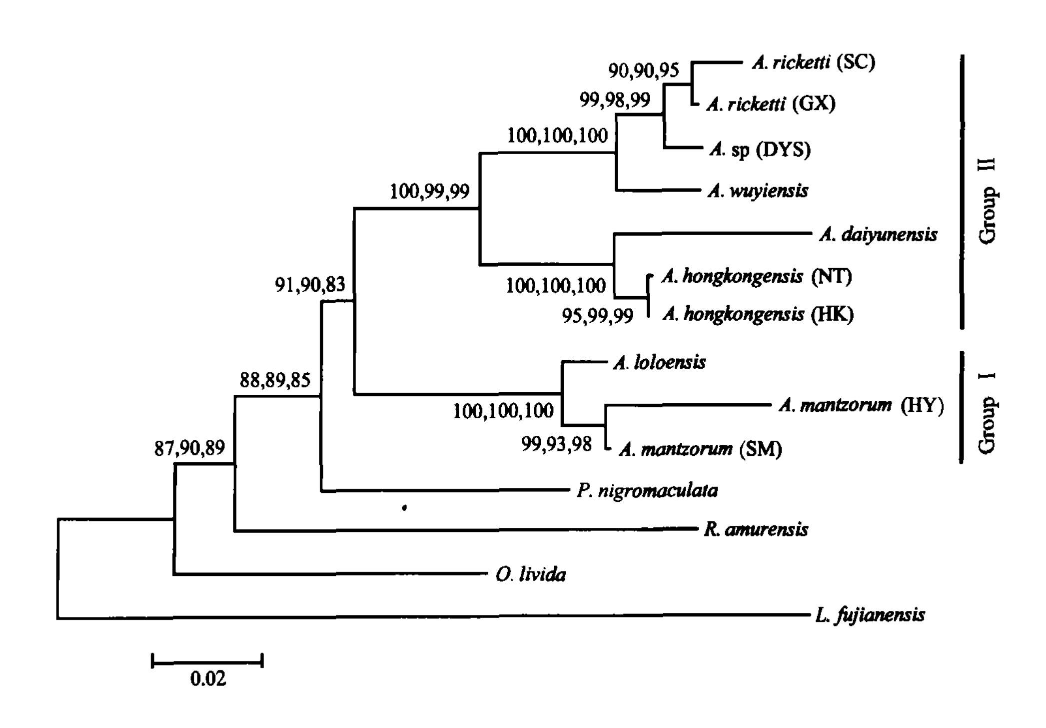


图1 湍蛙属6种（10个种群）的系统进化树

Fig. 1 The phylogenetic tree of six species (10 populations) of *Amolops*

结上的数字为分别来自于MP、ML和NJ法的自展值（1 000重复）。

Numbers at node are bootstrap values (1 000 replicates) from MP, ML, and NJ method, respectively.

10种群明显分为两大组，其结点的自展检验值(BSP)很高，均可达到80%以上。第一组中四川湍蛙的2种群首先相聚，再与棕点湍蛙构成姐妹支。第二组中香港湍蛙和戴云湍蛙聚为一支，其中香港湍蛙的2种群分化最小；大屿山离岛湍蛙种群首先与华南湍蛙相聚，共同与武夷湍蛙构成姐妹支，其中华南湍蛙两种群间的系统关系最近。

3 讨论

Pope & Romer (1951) 发现香港湍蛙，这是香港以前发现的湍蛙属唯一的物种，其在香港特别行政区只分布于香港岛和新界 (Karsen et al, 1998)。Jiang & Xie (2003) 首次在香港大屿山离岛发现的湍蛙属物种标本在形态上与香港湍蛙明显不同，因而很难归入香港湍蛙。在图1中，*A*. sp. (DYS) 首先和华南湍蛙相聚，再一起与武夷湍蛙构成姐妹群；而香港湍蛙、戴云湍蛙组成了另外一支。显然，大屿山的湍蛙不是香港湍蛙，分子分析的结果支持形态比较的结果，即香港有两个湍蛙物种。大屿山的物种与华南湍蛙系统关系很近，遗传距离分别为0.013、0.022，华南湍蛙两种群间为0.011 (表2)。华南湍蛙在广东全省境内几乎都有发现，但此前却未发现在香港特别行政区有分布；香港湍蛙仅分布于香港岛和新界；而此次发现的湍蛙物种分布于大屿山离岛，与广东沿海大陆隔海相望，处于香港新界的两端。因而，从地理分布来看，大屿山湍蛙似乎更可能是一新种。我们将进一步通过形态学的分析，寻找更多的信息，综合地确定其分类地位。

关于 Hu & Liu (1975) 发表的戴云湍蛙 (*A. daiyunensis*) 的物种有效性存在较多争议：如 Yang (1991b) 把戴云湍蛙定为香港湍蛙的同物异名；而 Fei (1999) 和 Zhao et al (2000) 把戴云湍蛙作为一有效种。我们的分子研究资料显示，香港湍蛙和戴云湍蛙遗传分化明显。香港湍蛙2个种群间遗传距离是0.001，香港湍蛙和戴云湍蛙遗传距离为0.043，而武夷湍蛙和华南湍蛙2个种群的遗传距离分别为0.039、0.030。香港湍蛙和戴云湍蛙遗传距离明显大于种群间的差异，达到了种级水平的差异，因此戴云湍蛙为一有效种是合理的。从系统关系树可看出 (图1)，它首先和香港湍蛙聚合，也就是说它和香港湍蛙有更近的系统关系。

四川湍蛙广布于四川、云南两省西部山区，曾有学者从中分别订立3个不同的物种，即 *A. kangtingensis* (Liu, 1950: 349)、*A. jinjiangensis* (Su et al, 1986)、*A. liangshanensis* (Wu & Zhao, 1984)。Liu & Hu (1961) 建议暂将康定湍蛙作为四川湍蛙的同物异名，而 Wu et al (1987) 依据细胞核型资料提出康定湍蛙为有效种。Yang (1991a) 将 *A. jinjiangensis* 记载为有效种；Zhao & Kraig (1993) 则认为金江湍蛙是凉山湍蛙的同物异名；Zhao & Yang (1997) 又将其作为有效种。Liu & Yang (1994) 认为这二者之间的关系难于从核型资料得到确定；Fei & Ye (2001) 则建议目前暂将它们均归入四川湍蛙。E & Chen (1984) 对四川湍蛙5个不同产地的眼晶状体蛋白电泳分析发现，其中西昌产四川湍蛙的蛋白条带明显和另外4处的不一样，支持凉山湍蛙的有效性；在本文的研究中，四川湍蛙的洪雅和石棉2个种群尽管首先相聚 (图1)，但它们间的遗传分化明显，遗传距离为0.032，与它们和棕点湍蛙间的平均距离相等 (分别为0.048、0.016)。这表明四川湍蛙内不同种群间具有很高的遗传分化，同时揭示现四川湍蛙各种群中可能还包含了一些不同的分类单元。因此很有必要对原四川湍蛙的不同种群进行系统的分子系统学研究。

Fei (1999) 把中国湍蛙属的物种分为5个种组。我们依据12*S*、16*S*rRNA基因片段构建的系统树中，内群明显分为2个种组，华南湍蛙、武夷湍蛙、戴云湍蛙、香港湍蛙聚为一组，棕点湍蛙和四川湍蛙构成另一组；分别对应于上述划分的华南湍蛙种组和四川湍蛙种组。因此，我们的研究结果在一定程度上支持 Fei (1999) 依据形态信息对上述2个种组的划分，而其他种组的合理性有待后续研究的证实。

致谢：香港野生动物基金会孙启元先生及其员工在野外采集中给予了重要帮助，谨此致以衷心感谢！

参考文献：

E WY, Chen SW. 1984. Studies on cyto-taxonomy of some species of Chinese anurans by electrophoresis of their lens proteins: Comparative analyses on lens proteins of some species in Ranidae, Rhacophoridae and Microhylidae by isoelectric focusing and SDS polyacrylamide gel electrophoreses [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, 3 (2): 25-32. [鄂未远，陈素文. 1984. 我国部分无尾两栖类眼晶状体蛋白的分子分类学探讨——蛙科树蛙科姬蛙科中部分种类眼晶状体蛋白电聚焦及SDS凝胶电泳的比较. 两栖爬行动物学报, 3 (2): 25-32.]

Fei L. 1999. Atlas of Amphibian of China [M]. Zhengzhou: Henan Publishing House of Science and Technology. 1-432. [费　梁. 1999. 中国两栖动物图鉴. 郑州：河南科学技术出版社. 1-

143.]

Fei L, Ye CY. 2001. Colored Atlas of Amphibians of Sichuan [M]. Beijing: China Forestry Press. [费 梁, 叶昌媛. 2001. 四川两栖动物图鉴. 北京: 中国林业出版社.]

Fei L, Ye CY, Huang YZ. 1990. Key to Chinese Amphibia [M]. Chongqing: Chongqing Branch, Science and Technology Literature Publishing House. 1-364. [费 梁, 叶昌媛, 黄永昭. 1990. 中国两栖动物检索. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社. 1-364.]

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. *Evolution*, **39**: 783-791.

Frost DR. 2004. Amphibian Species of the World: An Online Reference. Version 3.0 (22 August, 2004) [DB]. Electronic Database Accessible at http: //research. amnh. org/herpetology/amphibia/ index. html. New York, USA: American Museum of Natural History.

Hu SQ, Liu CC. 1975. Descriptions of three new species of anurans found in Fujian Province [J]. *Acta Zool. Sin.*, **21** (3): 263-271. [胡淑琴, 刘承针. 1975. 福建省两栖动物的三新种. 动物学报, **21** (3): 263-271.]

Jiang JP, Xie F. 2003. The diversity and living environment estimation of amphibian and reptile in the Lautau Island [A]. In: Wildlife Conservation Foundation. The 3rd Conference on the Present Status and Conservation of Wild Animals and Plants in Hong Kong New Information and Ecological Conservation Concerns for the Lantau Island [C]. 21-39. [江建平, 谢 锋. 2003. 香港大屿山离岛地区两栖动物多样性及其生存环境评述. 见: 野生动物保护基金会编. 第三次香港野生动物植物现状与保育研讨会大屿山离岛的资料与生态保育论文集. 21-39.]

Jiang JP, Zhou KY. 2001a. Evolutionary relationships among Chinese ranid frogs inferred from mitochondrial sequence 12*S* rRNA gene [J]. *Acta Zool. Sin.*, **47** (1): 38-44. [江建平, 周开亚. 2001a. 从12*S* rRNA基因序列研究中国24种蛙的进化关系. 动物学报, **47** (1): 38-44.]

Jiang JP, Zhou KY. 2001b. Phylogenetic relationships of Chinese brown frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of 12*S* ribosomal RNA gene [J]. *Zool. Res.*, **22** (1): 27-32. [江建平, 周开亚. 2001b. 中国林蛙的分子系统关系. 动物学研究, **22** (1): 27-32.]

Jiang JP, Zhou KY. (in press). Phylogenetic relationships among Chinese ranids inferred from sequence data set of 12*S* and 16*S* rDNA [J]. *Herpetological Journal*.

Jiang JP, Yuan FR, Xie F, Zheng ZH. 2003. Phylogenetic relation of some species and genera in Megophryids inferred from partial sequences of mitochondrial 12*S* and 16*S* rRNA genes [J]. *Zool. Res.*, **24** (4): 241-248. [江建平, 袁富蓉, 谢 锋, 郑中华. 2003. 基于线粒体12*S*和16*S*rRNA基因部分序列的角蟾亚科部分属种的系统发育关系. 动物学研究, **24** (4): 241-248.]

Karsen SJ, Lau MWN, Bogadek A. 1998. Hong Kong Amphibians and Reptiles, 2nd Edition [M]. Hong Kong: Provisional Urban Council.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6169-6200.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software [CP]. Temple, Arizona, USA: Arizona State University.

Liu CC. 1950. Amphibian of Western China [Z]. Fieldiana: Zool. Mem., Chicago USA, 2: 1-400. [刘承钊. 1950. 华西两栖类志. 芝加哥自历史博物馆动物学专著. 2: 1-400.]

Liu CC, Hu SQ. 1961. Tailless Amphibians of China [M]. Beijing: Science Press. Xiv +364. [刘承钊, 胡淑琴. 1961. 中国无尾两栖类. 北京: 科学出版社. Xiv +364.]

Liu WZ, Yang DT. 1994. A comparative study on karyotype and chromosome banding of three species on *Amolops* from southeastern China [J]. *Zool. Res.*, **15** (suppl.): 158-165. [刘万兆, 杨大同. 1994. 中国西南三种湍蛙的核型与带型的比较研究. 动物学研究, **15** (增刊): 158-165.]

Pope CP, Romer JD. 1951. A new ranid frog (*Staurois hongkongensis*) from Colony of Hongkong [J]. *Fieldiana: Zool.*, **31**: 609-612.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, **14**: 817-818.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, **4**: 406-425.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reacion primers [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, **87** (6): 651-701.

Su CY, Yang DT, Li SM. 1986. A new species of *Amolops* from the Hengduan Mountain [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **5** (3): 204-206. [苏承业, 杨大同, 利思敏. 1986. 横断山湍蛙属一新种. 两栖爬行动物学报, **5** (3): 204-206.]

Swofford DL. 1998. PAUP*, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4.0 [CP]. Sinauer, Sunderland, MA.

Thompson JD, Higgings DG, Gibson DJ. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice [J]. *Nucl. Acid. Res.*, **22**: 4673-4680.

Wu GF, Zhao EM. 1984. Two rare karyotypes of anurans: The karyotypes of *Staurois mantzorum* and *S. liangshanensis* [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **3** (4): 5-10. [吴贯夫, 赵尔宓. 1984. 无尾类两种罕见的核型——四川湍蛙及凉山湍蛙的核型. 两栖爬行动物学报, **3** (4): 5-10.]

Wu GF, Tan AM, Zhao EM. 1987. Cytological evidence for the validity of *Amolops kangtingensis* [J]. *Acta Herpetologica Sinica*, **6** (4): 39-41. [吴贯夫, 谭安鸣, 赵尔宓. 1987. 康定湍蛙为一有效种的细胞学证据. 两栖爬行动物学报, **6** (4): 39-41.]

Yang DT. 1991a. The Amphibia: Fauna of Yunnan [M]. Beijing: China Forestry Publishing House. 1-259. [杨大同. 1991a. 云南两栖类志. 北京: 中国林业出版社. 1-259.]

Yang DT. 1991b. Phylogenetic systematics of the *Amolops* group of ranid frogs of southeastern Asia and the Greater Sunda Island [J]. *Fieldiana: Zoology, Chicago (USA), new ser.*, **63**: 1-42.

Zhao EM, Kraig A. 1993. Herpetology of China [M]. Oxford, Ohio, USA: Published by Society for the Study of Amphibian and Reptiles in Cooperation with Chinese Society for the Study of Amphibian and Reptiles. 1-522.

Zhao EM, Yang DT. 1997. Amphibians and Reptiles of the Henduan Mountains Region [M]. Beijing: Sciences Press. 1-303, 47 (plates Ⅷ). [赵尔宓, 杨大同. 1997. 横断山区两栖爬行动物. 北京: 科学出版社. 1-303, 47 (图版Ⅷ).]

Zhao EM, Zhang XW, Zhao H, Kraig A. 2000. Revised checklist of Chinese amphibian and reptile [J]. *Sichuan Journal of Zoology*, **19** (3): 196-207. [赵尔宓, 张学文, 赵 蕙, 鹰 岩. 2000. 中国两栖纲和爬行纲动物校正名录. 四川动物, **19** (3): 196-207.]

附录1　湍蛙属6种（10个种群）12S和16S rRNA基因片段比对后的352个变异位点

Appendix 1　352 variable sites among 12S and 16S rRNA gene sequences from six species, 10 populations of Amolops

‘.’：一致性位点（Identical）；‘-’：插入缺失位点（Indel）

```
[                                                    11 1111111111 1111111111 1111111111 ]
[                             1111122 2223333344 5557889901 1222333344 4444455555 6777788889 ]
[                          3464568913 7891247935 3453892367 8028015601 2356701238 1345805792 ]
L. fujianensis             CC-ATTATCT TCACAAGCTT ATACC-AAGT TACAATCCCC CCCCACCACC AAGAATAAGT
O. livida                  ..GCAATA.. ..T..CCGA. TACT.-CC.G A.TC...AA. .TT.GTAT-T GC..G..G.C
R. amurensis               .TACAATA.. C...-CCAGC .ATT.-C..G A.T.TCTAAT ..T.G.T--T GC..G..G..
P. nigromaculata           .TGCAATA.C C...C.CAA. TAT..-.CTG AGT..CTAAT T.T.G...-T GC..GC.G.C
A. ricketti(SC)            ..GCAATA.. CT.T..CAAC CAT.TA...G AGTC..TAAT ..TTGTTTA. GCATGC.G.C
A. ricketti(GX)            ..GCAATA.. CT.T..CAAC TAT.TA...G AGTC..TAAT ..TTGTTTA. GCATGC.G.C
A. wuyiensis               .TGCAATA.. CT....CAAC TAT.TAC..G AGTC..TAAT ..TTGTTTA. GCATGC.G.C
A. sp. (DYS)               .TGCAATA.. CT.T..CAAC TAT.TA...G AGTC..TAAT ..TTGTTTA. GCATGC.G.C
A. hongkongensis(NT)       .TGCAATAT. CT.T..CAAC CAT.TTCC.G AG.C..TAAT T.T.GTTTA. GCACG..G.C
A. hongkongensis(HK)       .TGCAATAT. CT.T..CAAC CAT.TTCC.G AG.C..TAAT T.T.GTTTA. GCACG..G.C
A. daiyunensis             TTGCAATAT. CT....CAAC CAT.TTCC.G AG.C..TAAT T.T.GTTTA. GCATG..GCC
A. mantzorum(HY)           .TGCAATAT. C..TCGCAA. CAT..-CC.G A.TC...TAT T.T.G.T--T GC..GCCG.C
A. mantzorum(SM)           T.GCAATAT. C..TCGCAA. CAT..-CC.G A.TC...TAT T.T.G.T--T GC..GCCG.C
A. loloensis               T.GCAATAT. C..TCGCAA. CAT..-CC.G AGTC...TAT T.T.G.T--T GC..GCCG.C

[                          1111222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2333333333 ]
[                          9999000000 0011111111 2222222233 3355555566 6788899999 9000000011 ]
[                          3456123456 7901456789 0123456701 3503578903 7178923567 8245678901 ]
L. fujianensis             CCCT-TTCAA ATTATAGTTC TTAACA--AC CTGCTATGGA CGAAAGACA- TAATGCTGCA
O. livida                  G...ACAGT. ..AC.G.C.- ACC.ACGT.. ...TATG.T. TT.CC....- AG.G...ATG
R. amurensis               G..CGCAGTG .C.T.GA.C. ACC.TC--GT ..ATAGAATT T..TC....- A..GA..ATG
P. nigromaculata           G.T.ACAGT. GCCC.GA.C. -CC.TC--.. ...TCGAAT. ..GTT....- A..GA..CTG
A. ricketti(SC)            GT.AACAGTG GCCC.G...T G..TA.-C.A TC..CGAATT T..TC....- AG.A...ATG
A. ricketti(GX)            GT.AACAGTG GCCC.G...T G..TA.-C.A TC..CGAATT T..TC....- AG.A...ATG
A. wuyiensis               GT.AACAGTG GCCCCG.... A..TA.AC.. TC..CGAATT T..TC....- AG.G.T.ATG
A. sp. (DYS)               GT.AACAGTG GCCT.G...- A..CA.-C.A TC..CGAATT T..TC....- AG.A...ATG
A. hongkongensis(NT)       GT.AACAGT. .CCT.G...A ACCTA.AC.. T..TC.AAT. T..CG....T AGCG...ATG
A. hongkongensis(HK)       GT.AACAGT. .CCT.G...A ACCTA.AC.. T..TC.AAT. T..CG....T AG.G...ATG
A. daiyunensis             GTTAACAGT. .CCC.G...A ACCTA.AC.. T..TC.AAT. T..C.TGACA AGGA-..ATG
A. mantzorum(HY)           GT.--CAGT. .CCC.GACC. CCCT..--.. ....CGAAT. T..C.....- A..G..CATG
A. mantzorum(SM)           GT.--CAGT. .CCC.GACC. CCCT..--.. ....CGAAT. T..C.....- A..G..CATG
A. loloensis               G..--CAGT. .CCC.GACC. CCCT..--.. ....CGAAT. T..C.....- A..GA.CATG

[                          3333333333 3333333333 3333333334 4444444444 4444444444 4444444444 ]
[                          1122222223 3445555566 6677777880 0011111222 2223333344 4445555555 ]
[                          7902345672 7191245702 3524589783 4912379014 5683578904 5681234578 ]
L. fujianensis             -ACGCCACGC TTACGTCTAC CTTAACCGTA GCCAGTTAAA AAGGGTACCG ACGCAAAGTA
O. livida                  C.T.TTCT.. ...AAATGCT T.CCC.T.C. ......AC.C .......TT. ....G.....
R. amurensis               CCT.T..T.T ...AAG.GTT T.CCC.T.C. .....CA.GC .......... ....G.....
P. nigromaculata           CCT.T..T.. ..GAAATGTT TCCCT.T.C. ..-..C..GT ..A.TG...A ....G.....
A. ricketti(SC)            T...-.CTAT ...AAATGTT T.CCC.TAC. ..T.CC..GT .-....C..A C..AG.....
A. ricketti(GX)            T...-.CTAT ...AAATGTT T.CCC..AC. ....CC..GT .........A ....G.....
A. wuyiensis               T.TA-..TAT ...AAATGTT T.CCC..AC. ..A.CC..GT ......-..A ....G.....
A. sp. (DYS)               T...-.CTAT ...AAATGTT T.CCC..AC. ....CC..GT .........A ....G.....
A. hongkongensis(NT)       C.T.-..T.. ...AAATGTT T..TCTT.C. .........C .........A ....G.....
A. hongkongensis(HK)       C.T.-..T.. ...AAATGTT T..TCTT.C. .........C .........A ....G.....
A. daiyunensis             C.T.-..T.T ...AAATGTT T..TTTT.CT .AA......C TT....C..C T...G....C
A. mantzorum(HY)           C.T.T....T CC.AAATGTT T.CCC.T.CT A.AT.-CTGT GTAA.....A TACAGCGAGT
A. mantzorum(SM)           C.T.T....T CC.AAATGTT T.CCC.T.C. .....C..GT .........A ....G.....
A. loloensis               C.T.T....T C..AAATGTT T.CCC.T.C. .....C..GT .........A ....G.....
```

（转下页）

(接上页)

[	4444444444	4445555555	5555555555	5555555566	6666666666	6666666666]
[	6666677788	8890011111	2222333455	6677777700	1111111222	2222223333]
[	3456907845	6815613467	1789039901	3923456958	0345678023	4567890123]
L. fujianensis	AATCACTCAA	GACTCGGTAT	GCCATTGCTT	GAGCTAACTA	CATGTCACTC	----CACTAA
O. livida	......CT.G	..A....C..	...CCC.TCC	AGTTA.TT..	..CA.AC.C.	AT--.G....
R. amurensis	.......T.G	..TCTA.C..	.TTT...TC.	AGTAA.GT..	TCCA.GC..A	TG--TG..CC
P. nigromaculata	C.AT...T.G	.......C..	-TTTCCATC.	AGTAACCTC.	T.CA.AT...	TACG....T.
A. ricketti(SC)	....CA.T..	..T...AC..	.T.TCC.TC.	AGTAACCTAG	.-CAAAC...	TACG....T.
A. ricketti(GX)	.......T..	......AC..	.TTTCC.TC.	AGTAACCTAG	.-CAAAC...	TACG....T.
A. wuyiensis	.......T..	......ACG.	.TTTCC.TC.	AGTAACCTAG	.-.AAAC...	TACG....T.
A. sp. (DYS)	.......T..	..T...AC..	.TTTCC.TC.	AGTAACCTAG	T-CAAAC...	TACG....T.
A. hongkongensis(NT)	.......T..	..T...ACG.	.TTTCC.TC.	AGTAACCTAG	.-C--ACA..	TATG..T.T.
A. hongkongensis(HK)	.......T..	..T...ACG.	.TTTCC.TC.	AGTAACCTAG	.-C--ACA..	TATG..T.T.
A. daiyunensis	.T.....T.T	.TT....CGC	.TATCC.TC.	AGTAACCTAG	.-C--ACA..	TATG....T.
A. mantzorum(HY)	G-.T...TCT	A......CG-	ATT-CC.TC.	AGTGACCT..	..CACAC...	TACT....C.
A. mantzorum(SM)	.......T..	.......CG.	.TTTCC.TC.	AGTGACCT..	..CACAC...	TACT....C.
A. loloensis	.......T..	.......CG.	.TTTCC.TC.	AGTGACCT..	..CACAC.C.	TACG...CC.

[	6666666666	6666666666	6666666666	6666666667	7777777777	7777777777]
[	3333334444	4445555555	5566666666	6778899990	1111112222	2223333444]
[	4567890134	5790123456	7801234567	9362735890	0124570235	6782568123]
L. fujianensis	ACCCACCTAA	AAAGAAAGGT	TAGATCATTG	TGTTAAACAA	TGAGAAACTT	AATACTCGCT
O. livida	.A.-.T.ACT	.GCTCG...G	CC.TATG...	.ACG.C.TC.	CA.A.TGTAA	..CT.C.TT.
R. amurensis	TA.AC...-T	...C..TA.G	.CACATG..A	.A...TT.TT	.AGA.TGTAA	T.CT.C.TAC
P. nigromaculata	.A....T.--	TGCC..GA.A	CCCTATG..A	...GGT.ATT	C..A.TGT.A	TGCT.C.A.C
A. ricketti(SC)	.A...AT.--	TGCT..GA.A	CC.TAAGCC.	CA.GG...CT	C..A.CGAAA	CGCT.CTAT.
A. ricketti(GX)	.A...AT.--	TGCT..GA.A	CC.TAAGCC.	CA.GG...CT	C..A.CGAAA	CGCT.CTAT.
A. wuyiensis	.AT..ATC--	TGCT..GA.A	CC.TCAGCCA	CA.GG..TTT	C..A.CGAAA	CGC..CTAT.
A. sp. (DYS)	.AT..AT.--	CGCC..GA.A	CC.TAAGCCA	CA.GG.T.CT	C..A.CGAAA	CGCT.CTAT.
A. hongkongensis(NT)	.AT..ATA--	TGCC..GAAA	CC-GCA.AC.	CA.GGT..CT	C..A.CGA.A	CGCT.CAATG
A. hongkongensis(HK)	.AT..ATA--	TGCC..GAAA	CC-GCA.AC.	CA.GGT..CT	C..A.CGA.A	CGCT.CAATG
A. daiyunensis	.AT..ATA--	TGCC..GAAA	CCAGCA.AC.	CA.GGT..CT	C..A.CGA.A	CGCTACAATG
A. mantzorum(HY)	.AT..A.A--	T.CC..GA.A	CTATGT....	.A.GGT.TC.	...AGC.TAA	C.CT.CTA.C
A. mantzorum(SM)	.AT..A.A--	T.CC..GA.A	CTATGTG...	.A.GGT.TC.	...AGC.TAA	C.CT.CTA.C
A. loloensis	.A...ATA--	CGCC..GA.A	CT.TGTG...	.A.GGT.TC.	...AGCGTAA	T.CT.CTA.C

[	7777777777	7777777777	7777777788	8888888888	8888889999	99]
[	4445555666	6666777777	8888888901	3333344444	5579990011	12]
[	6781678014	5789012469	2345679612	0245812349	4651293927	99]
L. fujianensis	TACCATCCTT	TGACATACTT	GGCAACCCCG	CTTCGCCCCG	AGTCACATAT	TA
O. livida	A.AT...TCA	A..TG.TA.C	.AT..T.T..	.CC.......	G..T.....C	.G
R. amurensis	A..T..TT.A	CA.TGCTACC	.AT.TT.TT.	TC..C.G.A.	GACTG.GCCC	.G
P. nigromaculata	AG.T...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T....	TC......-.	GA.T..C.TC	.G
A. ricketti(SC)	A.TT...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T....	TC.T..T.A.	GA...TC..C	.G
A. ricketti(GX)	A.TT...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T....	TC.T..T.A.	GA...TC..C	.G
A. wuyiensis	A.TT...A.A	C..T..TA.C	.ATT.T....	TCCT....A.	GA.T..C..C	.G
A. sp. (DYS)	A.TT...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T....	TC.T..T.A.	GA....C..C	.G
A. hongkongensis(NT)	A.TT...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T....	TC.......A	GA.T..C..C	.G
A. hongkongensis(HK)	A.TT...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T....	TC.......A	GA.T..C..C	.G
A. daiyunensis	A.TT...A.A	C..TG.TA.C	.ATT.T...A	TCA..A.A:A	GA.T..C..C	AG
A. mantzorum(HY)	A.TTGC.A.A	..TTG.CA.C	AATT..T...	TC-.....-.	GA.T..C..C	.G
A. mantzorum(SM)	A.TTGC.A.A	..TTG.CA.C	AATT..T...	TC........	GA.T..C..C	.G
A. loloensis	A.TTGC.A.A	..TTG.CA.C	AATT..T...	TC........	GA.T..C..C	.G